

⑩ 日本国特許庁 (JP) ⑪ 特許出願公開  
⑫ 公開特許公報 (A) 昭59—113896

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup> 識別記号 庁内整理番号 ⑬ 公開 昭和59年(1984)6月30日  
C 12 P 17/18 7258—4B  
/(C 12 P 17/18  
C 12 R 1/01 ) 6760—4B 発明の数 2  
(C 12 P 17/18 審査請求 未請求  
C 12 R 1/645) 6760—4B (全 7 頁)

⑭ ピロロキノリンキノンの製造方法

⑯ 特 願 昭57—220328

⑰ 出 願 昭57(1982)12月17日

⑱ 発 明 者 飴山実

山口市大内御堀44の1

⑲ 発 明 者 足立収生

山口市宮野下平野2034

⑳ 出 願 人 宇部興産株式会社

宇部市西本町1丁目12番32号

㉑ 代 理 人 弁理士 青木朗 外 3 名

明 細 書

1. 発明の名称

ピロロキノリンキノンの製造方法

2. 特許請求の範囲

1. グルコノバクター属、アセトバクター属、ミクロコッカス属、シュードモナス属、コリネバクテリウム属、エシエリヒア属、サルシナ属、セラチア属、エルビニア属、クレブシラ属、アシネトバクター属、ハイホミクロビウム属、メチロコッカス属、ラクトバチルス属、ストレプトコッカス属、サッカロミセス属、カンジタ属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウム属及びストレプトミセス属の少なくとも一つに属するピロロキノリンキノン生産能を有する微生物を栄養培地中で培養して培養物中にピロロキノリンキノンを生成せしめ、これを採取することを特徴とするピロロキノリンキノンの製造方法。

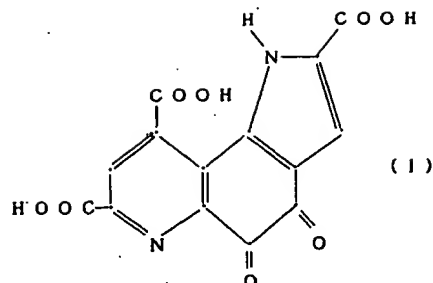
2. グルコノバクター属、アセトバクター属、ミクロコッカス属、シュードモナス属、コリネバクテリウム属、エシエリヒア属、サルシナ属、セ

ラチア属、エルビニア属、クレブシラ属、アシネトバクター属、ハイホミクロビウム属、メチロコッカス属、ラクトバチルス属、ストレプトコッカス属、サッカロミセス属、カンジタ属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウム属及びストレプトミセス属の少なくとも一つに属するピロロキノリンキノン生産能を有する微生物を栄養培地中で培養して得られた微生物細胞を分離し、この分離微生物細胞の存在下に糖質とアミノ酸を反応させてPQQを生成せしめることを特徴とするピロロキノリンキノンの製造方法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は細胞を用いて下記化学構造式(1)のピロロキノリンキノン(以下PQQと略称)を製造する方法に関する。

以下余白



PQQはキノ酵素のアポ型酵素をホロ化して酵素を活性化する能力を有し、メタノール酸化性細菌のメタノール脱水素酵素、酢酸菌のアルコール脱水素酵素、アルデヒド脱水素酵素又はグルコース脱水素酵素などの補酵素として機能しているほか、動物、植物及び微生物起源のアミノ酸化酵素及びアミン脱水素酵素又は一部のアミノ酸ラセマーゼの補酵素として、生理学的に重要な機能を有する物質である。更に他の酸化還元酵素や転位酵素の補酵素、例えばチアミンピロリン酸、ニコチンアミドアデニンジスクレオチド、ニコチンアミドアデニンジスクレオチドホスフェート、ピリド

キサルホスフェート、フラビンアデニンジスクレオチド、フラビンモノスクレオチドなどは、それぞれ、ビタミンB<sub>1</sub>、ニコチン酸、ビタミンB<sub>6</sub>、ビタミンB<sub>2</sub>などの型で摂取することが必須である。これと同様に、PQQは重要な酵素反応の補酵素となって機能していることから未同定ではあるがPQQもビタミン作用を有するきわめて重要な物質であるといえる。いずれにせよ、PQQは補酵素として酵素反応又は物質代謝系を活性化するものであり、医薬品として重要な役割を果たす物質である。

従来、PQQの製造法としては有機化学的合成法が知られている（例えばJACS., 103巻、5599～5600頁（1981）参照）。しかしながら、有機化学的合成法には、合成反応が多段階から成るために製造に時間を要し、異性体をはじめとする副生物の除去のために煩雑な操作を必要とし、またPQQの収率も低いという問題があった。

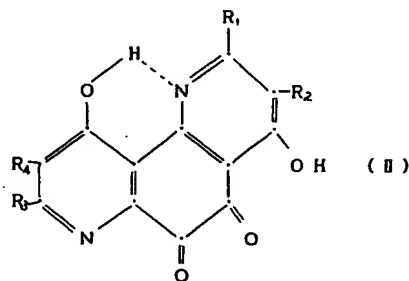
本発明者らはかかる従来のPQQの合成法の間

題点を排除し、高純度のPQQを簡単な操作で短時間かつ高収率で経済的に製造できる方法を開発すべく鋭意研究をすすめた結果、細胞、特に微生物を培養することによりPQQを大量かつ経済的に供給することができることを見出し、本発明をするに至った。

すなわち、本発明に従ったPQQの製造方法は、グルコノバクター属、アセトバクター属、ミクロコッカス属、シュドモナス属、コリネバクテリウム属、エシエリヒア属、サルシナ属、セラチア属、エルビニア属、クレブシラ属、アシネトバクター属、ハイホミクロビウム属、メチロコッカス属、ラクトバチルス属、ストレプトコッカス属、サッカロミセス属、カンジタ属、アスペルギルス属、ペニシリウム属、フザリウム属及びストレプトミセス属の少なくとも一つに属するピロキノリンキノン生産能を有する微生物を栄養培地中で培養して培養物中にピロキノリンキノンを生成せしめ、これを採取することから成る。

PQQの製造方法として細胞、特に微生物の細

胞を培養してその培養液中にPQQ（及びその類縁化合物）を生成蓄積せしめ、これを例えば抽出によって採取する方法は本発明方法が最初であり、かかる方法によりPQQの大量供給が可能となり、例えばPQQの医薬用としての開発と利用に大きく貢献することができる。なお、PQQと同時に生産される可能性のあるPQQの類縁化合物としては、例えば下記式（II）のフェナンスロリンジオンが考えられる。



（上記式において、 $R_1 = R_3 = \text{COOCH}_3$ ,  $R_2 = R_4 = \text{H}$ ;  $R_1 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_2 = R_4 = \text{COOCH}_3$ ; 又は  $R_1 = R_4 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{COOC}_2\text{H}_5$ ,  $R_3 = \text{COOCH}_3$ ）

本発明方法において使用することのできるPQQ生産能を有する微生物としては、グルコノバクター属 (*Glucobacter industrius* IFO 3260, *Glucobacter suboxydans* IFO 12528)、アセトバクター属 (*Acetobacter aceti* IFO 3284, *Acetobacter ascendens* IFO 3299)、マイクロコッカス属 (*Micrococcus roseus* IFO 3764)、シュードモナス属 (*Pseudomonas fluorescens* IFO 3081, *Pseudomonas AMI NCIB 9133*)、コリネバクテリウム属 (*Corynebacterium sepedonicum* IFO 13763)、エシエリヒア属 (*Escherichia coli* K-12 IFO 3301)、サルシナ属 (*Sarcina lutea* IFO 12708)、セラチア属 (*Serratia marcescens* IFO 3046)、エルビニア属 (*Erwinia herbicola* IFO 12686)、クレブシラ属 (*Klebsiella pneumoniae* IFO 3317)、アシネトバクター属 (*Acinetobacter calcoaceticus* IFO 12552)、ハイホミクロビウム属 (*Hyphomicrobium neptunium* ATCC 15444)、メチロコッカス属 (*Methylococcus capsulatus* ATCC 19069)等に属するバクテリア、

ラクトバチルス属 (*Lactobacillus casei* IFO 3425)、ストレプトコッカス属 (*Streptococcus faecalis* IFO 3181)、サッカロミセス属 (*Saccharomyces cerevisiae* AKU 4100)、カンジタ属 (*Candida utilis* AKU 4570)、アスペルギルス属 (*Aspergillus oryzae* AKU 3301)、ペニシリウム属 (*Penicillium chrysogenum* Thom AKU 3407)、フザリウム属 (*Fusarium culmorum* AKU 3706)、ストレプトミセス属 (*Streptomyces albus* AKU 2201)等の属に属する乳酸菌、酵母、糸状菌、放線菌及び不完全菌に属す微生物があげられる。その他、タバコをはじめとする植物カルス、ほ乳動物の白血球細胞や肝細胞などの細胞もPQQの生産能を有する。

本発明方法において使用することのできる培地としては、前記微生物などが培養により増殖し得るものであれば任意のものでよく、例えばグリセロール、マニトールなどの糖アルコール類、グルコース、フルクトースなどの還元糖類、蔗糖、マルトースなどの二糖類や炭水化物の加水分解物の

ほか、蔗糖蜜、亜硫酸パルプ廃液および酢酸、グルコン酸などの糖酸が利用できる。例えばシュードモナス AMI NCIB 9133やメチロコッカスキャプシュレータス ATCC 19069 などのようなメタノール酸化性菌の場合には、メタノール、メチルアミン及びメタンなどを炭素源とすることができる。窒素源としては、アミノ酸、核酸類のほかに蛋白質加水分解物、酵母エキス、コーンステープリカーのような有機態のものや、アンモニウム塩、硝酸塩などの無機態のものを使用することができる。

本発明方法は、前記したように、糖質を原料として直接発酵法により培養液中にPQQを生成蓄積させる方法の他に、別途に培養して調製した微生物細胞の洗浄細胞懸濁液にPQQ生合成の前駆体となりうる化合物、すなわち、グリセロール、マニトール、フルクトース、グルコースなどの糖質とグルタミン酸、アスパラギン酸、アラニンなどのアミノ酸の混合物を加えて反応させ、反応液中に生成するPQQを取得することでもできる。

本発明方法における培養は好氣的条件下に、例えば通気攪拌や往復振盪方法によって培養することができる。培養条件は、特に限定はないが、一般的に言えば、温度0～40℃、pH2～9及び20～100時間程度の条件で実施する。

培養液又は培養物からのPQQの採取方法は慣用方法に従って行うことができる。例えば、イオン交換クロマトグラフィー、濃縮物のゲル濾過法、凍結乾燥物の溶媒抽出法あるいはアフィニティクロマトグラフィーなどが利用できる。

PQQの補酵素活性の検定と、培養液中の生成物の濃度の検定は、次のようにして行うことができる。キノ酵素のアポ酵素の調製には、発明者らがすでに発表した方法 (FEBS Letters, 130巻、179～183頁、1981年)において使用したシュードモナス・エルギノサ IFO 3445のD-グルコース脱水素酵素活性欠損変異株を用いることができる。本菌株はPQQ生成能を欠くが、その細胞膜中には通常のレベルのアポD-グルコース脱水素酵素を生成蓄積している。このような変異

株より調製した細胞膜画分にPQQ(及び類縁化合物)を含む培養液、反応液あるいは菌体抽出液を加えることによって、アボ酵素はホロ化され、D-グルコース脱水素酵素活性が発現する。発現する酵素活性の強度が、添加されたPQQの量に比例関係を示すPQQの濃度域を、化学合成したPQQを用いて測定し検量線を作成することによって、培養液等の試料中に含まれるPQQ量を求める(第1図、検量線)。PQQを定量することは、PQQを補酵素とする他の種類のキノ酵素からアボ酵素を調製し、これにPQQを添加することによって酵素を活性化することで同様に行うことができる。また、PQQの定量は高速液体クロマトグラフィーによっても行うことができる。

以下に本発明の実施例を説明するが、本発明の範囲をこれらの実施例に限定するものでないことはいうまでもない。

#### 実施例1

500ml容三角フラスコに、グリセロール0.4%、グルタミン酸ナトリウム0.6%、 $K_2HPO_4$

0.05%、 $KH_2PO_4$ 0.05%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.02%、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%、NaCl0.001%、 $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 0.001%、チアミン塩酸0.00004%、ニコチン酸0.00004%、パントテン酸カルシウム0.00004%、パラアミノ安息香酸0.00001%を含む培地100mlを加え、これにグルコノバクター・インダストリウスIFO 3260を接種して、100~120rpmで振盪し乍ら通気培養した。

第2図はその培養経過を示したもので、菌の生育が対数増殖期末期から定常期初期にあたる時期に培養液中のPQQの蓄積が最高になることを示している。第2図は、培養中の培養液の一部を無菌的にとり出し、遠心分離して菌体を除去して得られる上清0.1mlを33マイクログラムのアボD-グルコース脱水素酵素を含む細胞膜画分に加え、室温で30分放置して酵素をホロ化させたのち、発現した酵素活性の強度から培養液中のPQQ濃度を算出してグラフに示したものであり、菌の生育は600nmでの吸光度で表示した。

酵素活性を求めるために、予めホロ化した上記の酵素液(0.11ml)に50mMトリスヒドロキシアミノメタン-塩酸緩衝液、pH8.75にアジ化ナトリウムを24mM含むもの1ml、6.7mM、2,6-ジクロロフェノールインドフェノール0.04ml、6mMフェナジンメトスルフェート0.2mlを加え、反応液全量を水で2.9mlとし、25℃で600nmの吸光度変化を調べ、同様に調製した盲検との間で吸光度に増減が生じないことを確認した。次いで8mMアジ化ナトリウムを含む1Mグルコースを一方のキューベットに0.1ml加え、その時点以降の吸光度変化をレコーダーで記録した。ホロ化の程度及びホロ酵素の濃度と2,6-ジクロロフェノールインドフェノールの退色とがよい相関を示す。化学合成されたPQQを用いて、同様の操作によって得た第1図の検量線から各試料中のPQQ濃度を算出した。PQQが最高に生成される時点で培養を停止し、菌体を除去して得られる培養液をアンバーリストA-21カラム(オルガノ製)に吸着させ、0.35MNaCl

を含む50%メタノールによって不純物を溶出させたのち、飽和NaClを含む50%メタノールによって溶出されてくる画分にPQQが含まれていた。

得られたPQQ画分を下記条件で液体クロマトグラフィー分析を行ったところ、化学合成されたPQQと両者はピークの保持時間(13分)が一致していた。

機 器：日本分光製高速液体クロマトグラフ、トライローター

カラム：HW-40S(トヨパール)

溶離液：水-アセトニトリル(1:1)

検出器：UV(254nm)

流 速：1.0ml/min

次に、PQQ画分から大量分取して、PQQを単離し、PQQ5.2μgを得た。

#### 実施例2

シュードモナスAM1 NCIB9133をメタノール0.4%、硫安0.1%、 $KH_2PO_4$ 0.15%、 $K_2HPO_4$ 0.15%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

0.003%を含む培地で30℃で60~90時間実施例1と同様にして通気かくはん培養した。この間、メタノールを0.1%ずつ24時間ごとに補充して培養を行った。60~72時間の培養でPQQの生成量は $2 \sim 3 \times 10^{-7}$ Mに達した。PQQ濃度の検定法及びPQQの単離法は実施例1と同様に行った。得られたPQQは8 $\mu$ gであった。

シュードモナスAMI NCIB9133を用いて、実施例1に示した培地と同組成の培地を用いてPQQの生成を行わせて場合も70~100時間の培養で $2 \sim 3 \times 10^{-7}$ MのPQQ濃度に達した。

### 実施例3

微生物による物質生産がフィードバック調節されることはしばしば見られることであるが、PQQ生成もその例外ではない。フィードバック調節による制御を受けずにPQQを生成させた例を以下に示す。

実施例1に示した培地と同組成の培地に菌株(グルコノバクター・インダストリウス IFO

3260、アセトバクター・アセチIFO3284、シュードモナスAMI NCIB9133などのうち1菌株)を接種して30℃で通気かくはん培養を行った。この際、陰イオン性イオン交換樹脂(アンバーリストA-21)を透析チューブに入れてあらかじめ滅菌しておいたものを培養フラスコの中へ入れた。培地100ml当たり1gのイオン交換樹脂を加えた。細胞によって培養液中に生成されるPQQは透析膜を通してイオン交換樹脂に吸着されるため、培養液中のPQQ濃度はイオン交換樹脂を添加しないで培養した場合の培養液と比較すると、培地中のPQQ濃度は10分の1以下に保たれていた。イオン交換樹脂を添加しなかった培養では培養液中のPQQ濃度が著しく減少する定常期末期(約100時間目)まで培養を続けたのち、透析膜を取り出し、封入されていたイオン交換樹脂からPQQの溶出を行った。得られたPQQは15~20 $\mu$ gであった。

### 実施例4

グルコノバクター・サブオキシダンスIFO

12528を実施例1に示した培地と同組成の培地を用いてPQQの生成を行わせた。その結果、30時間の培養で $1.0 \times 10^{-9}$ MのPQQ濃度に達した。

### 実施例5

アセトバクター・アセチIFO3284を実施例1に示した培地と同組成の培地を用いてPQQの生成を行わせた。その結果、30時間の培養で $1.0 \times 10^{-8}$ MのPQQ濃度に達した。

### 実施例6

アセトバクター・アセンデンスIFO3299を実施例1に示した培地と同組成の培地を用いてPQQの生成を行わせた。その結果、30時間の培養で $5.2 \times 10^{-8}$ MのPQQ濃度に達した。

### 実施例7

50 $\ell$ 容培養タンクに、実施例1で用いたのと同じ組成の培地30 $\ell$ を加え、これにグルコノバクター・インダストリウスIFO3260を接種し、30 $\ell$ /分の通気及び500rpmの攪拌条件下に通気培養した。24時間経過後のPQQ濃

度はロットNo1で $6.0 \times 10^{-8}$ M(収量0.63 $\mu$ g)、ロットNo2で $1.2 \times 10^{-8}$ M(収量1.17 $\mu$ g)であった。

### 実施例8

実施例1に示した培地と同組成の培地を用いて下記第1表に示す菌体を用いて培養を行なった。得られた菌体を蒸留水で洗浄後、菌体1容に対し9容のメタノールを加えて一夜攪拌した。遠心分離によって菌体を除去した上清を蒸発乾固させ、これに水を加えて実施例1と同様にPQQを定置した。結果を以下の第1表に示す。PQQは菌体中のタン白( $\mu$ g)当りの量で示した。

以下余白

## 特開昭59-113896(6)

第1表

菌	体	PQQ濃度 ( $\times 10^{-8}$ mole/ mg 蛋白)
アセトバクター・アセチ	IFO 3284	0.56
アセトバクター・アセンデンス	IFO 3299	1.70
アセトバクター・ランセンス	IFO 3298	0.19
グルコノバクター・セリヌス	IFO 3268	1.46
グルコノバクター・サブオキシダンス	IFO 3254	7.51
グルコノバクター・サブオキシダンス	IFO 12528	1.76
グルコノバクター・インダストリウム	IFO 3260	6.43
グルコノバクター・メラノジェナス	IFO 3293	6.40
グルコノバクター・スフェリカス	IFO 12467	0.86
セラチア・マルセセンス	IFO 3046	0.04
シュードモナス・オパリス	IFO 3738	0.03

## 実施例 9

実施例 1 に示した培地と同組成の培地を用いて

グルコノバクター・インダストリウス IFO 3260 の培養を行ない、得られた菌体を蒸留水で洗浄後、 $OD_{600} = 1.0$  になるように菌体に蒸留水を加えてこれを洗浄細胞懸濁液とした。

洗浄細胞懸濁液を  $OD_{600} = 1.0$  になるように 0.1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で希釈した後、この希釈液にグリセロール濃度が 0.4 %、グルタミン酸濃度が 0.6 % になるようにグリセロール又はグルタミン酸を加えて 30 °C で反応を行った。生成した PQQ は実施例 1 と同様に定量した。

結果を以下の第 2 表に示す。

以下余白

第2表

添 加 物	PQQ 濃度 ( $\times 10^{-8}$ M)	
	6時間後	15時間後
グリセロール	14.3	21.7
グリセロール+グルタミン酸	24.1	14.0
な し	2	6

## 実施例 10

実施例 1 に示した培地と同組成の培地を用いて以下の第 3 表に示した各種微生物により PQQ の生成を行なわせた。30 時間後の PQQ 濃度を第 3 表に示す。

以下余白

第3表

菌	体	PQQ 濃度 ( $\times 10^{-8}$ M)
マイクロコッカス・ロゼウス	IFO 3764	0.1
シュードモナス・フルオレセンス	IFO 3081	0.3
コリネバクテリウム・セベドニカム	IFO 13763	0.1
エシエリヒア・コリ	K-12 IFO 3301	0.1
サルシナ・ルチア	IFO 12708	0.1
セラチア・マルセセンス	IFO 3046	0.1
エルビニア・ヘルビコーラ	IFO 12686	0.1
クレブシラ・ニューモニア	IFO 3317	0.1
アシネトバクター・カルコアセティカス		
	IFO 12552	0.3
ハイホミクロビウム・ネブツニウム	ATCC 15444	0.1
メチロコッカス・キャプシュレイタス	ATCC 19069	0.2

(注) メチロコッカス・キャプシュレイタス ATCC 19069 はグリセロールの代わりにメタノール 1 % を

炭素源として用いた。

#### 実施例 1

3%麦芽汁培地を用いて以下の第4表に示す菌体を通気攪拌培養してPQQを生成させた。得られた結果を30時間後のPQQ濃度として以下の第4表に示す。

第4表

菌 体	PQQ濃度 ( $\times 10^{-8}$ M)
ラクトバチルス・カゼイ IFO 3425	0.1
ストレプトコッカス・フェカリス IFO 12964	0.1
サッカロミセス・セレビジェ AKU 4100	0.1
カンジタ・ウチルス AKU 4570	0.1
アスペルギルス・オリゼ AKU 3301	0.1
ペニシリウム・クリソジェナム AKU 3407	0.1
フザリウム・カルモラム AKU 3706	0.1
ストレプトミセス・アルブス AKU 2201	0.1

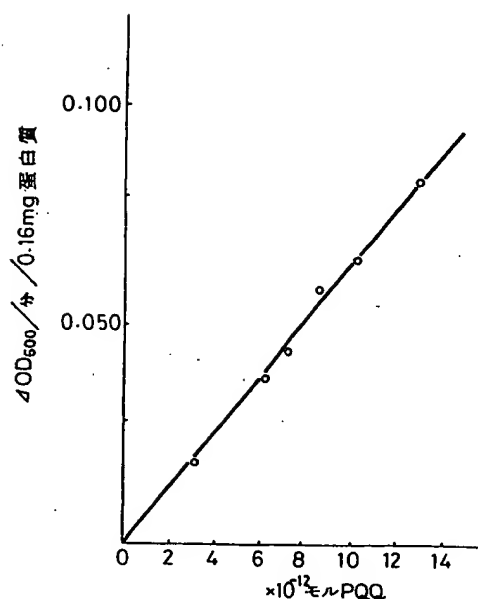
特開昭59-113896(7)

#### 4. 図面の簡単な説明

第1図は培養液等の試料中に含まれるPQQの量を求める検量線を示すグラフ図であり、図の縦軸は0.16mgの膜を用いた場合の600nmにおける1分当りの吸光度差( $\Delta OD_{600}/分/0.16$ mg蛋白質)を示し、横軸はPQQモル濃度( $\times 10^{-8}$ )を示す。

第2図は実施例1の培養経過を示すグラフ図であり、図の横軸は培養時間(時間)を示し、左縦軸はPQQ濃度( $\times 10^{-8}$  M)を示し、右縦軸は菌の生育( $OD_{600}$ )を示したものであり、曲線(1)はPQQ濃度、曲線(2)は菌の生育を示す。

第1図



第2図

